

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อรา

จากการแยกเชื้อราจากตัวอย่างต่างๆพบว่า มีเชื้อราที่สามารถเจริญได้บน chitin overlay ได้จำนวน 106 ไอโซเลท ดังตัวอย่างเชื้อราบางไอโซเลท และแหล่งที่เก็บตัวอย่างในตาราง 4

ตาราง 4 เชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างต่างๆที่สามารถเจริญได้บน chitin overlay plate

ไอโซเลท	แหล่งเก็บตัวอย่าง
CK ₁	ดินบริเวณที่มี Boletes ขึ้นที่ห้วยคอกม้า
CK ₂	เชื้อราที่ปนเปื้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อ
CK ₃ -CK ₁₉	ดินบริเวณคอยสุเทพ จ.เชียงใหม่
CK ₂₀ -CK ₂₂	แหนมเห็ด
CK ₂₃ -CK ₂₅	เชื้อราที่เจริญบนเห็ด
CK ₂₆ -CK ₂₈	ดินไปจากแม่ฮ่องสอนเก็บโดย ผศ.ดร.นริทธิ์ สีสวรรณ
CK ₂₉ -CK ₄₄	เปลือกกุ้งฝิ่งดิน
CK ₄₅ -CK ₅₅	เปลือกกุ้งฝิ่งดินบริเวณใต้ต้นไม้ยม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
CK ₅₄ -CK ₅₆	เปลือกกุ้งฝิ่งดินบริเวณใต้ต้นไม้ม่วง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
CT ₁	เศษไม้ขึ้นรา
CT ₁	เชื้อราที่ปนเปื้อนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
CT ₃ -CT ₁₇ , CT ₂₀ , CT ₂₁	เปลือกกุ้งฝิ่งดินบริเวณใต้ต้นไม้ยม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
CT ₁₈ -CT ₁₉	กุ้งขึ้นราจาก อ.อภิญญา ผลิโกมล
CT ₂₂ -CT ₂₄	กะปิ
CT ₂₅	แมลงขึ้นรา
CT ₂₆ , CT ₃₈ -CT ₄₆ , CT ₄₈ -CT ₅₀	ดินบริเวณหนองป่าครั่ง อ.เมือง จ.เชียงใหม่

ตาราง 4 (ต่อ)

ไอโซเลท	แหล่งเก็บตัวอย่าง
CT ₂₇ , CT ₂₈ , CT ₃₆ , CT ₃₇	เชื้อราที่ขึ้นบนเห็ดเผาะ
CT ₂₉ , CT ₃₅	เชื้อราที่ขึ้นบน <i>Xylaria</i> sp.
CT ₃₀ -CT ₃₄	เชื้อราที่ปนเปื้อนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
CT ₄₇	เชื้อราที่ปนเปื้อนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. การคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตโคคิเนสได้สูงในอาหารเหลว

จากการเลี้ยงเชื้อรา 106 ไอโซเลทที่แยกได้ในอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์โคคิเนสพบว่า เชื้อรา 20 ไอโซเลทให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุดดังตาราง 5

ตาราง 5 Enzyme activity และ specific activity ของเอนไซม์โคคิเนสจากเชื้อรา 20 ไอโซเลท ที่ให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุดในอาหารเหลว

ไอโซเลท	Enzyme activity (mU/ml enzyme)	Specific activity (mU/mg)
CK ₅₀	56.0	0.442
CK ₄₄	54.0	0.450
CK ₁₇	54.0	0.506
CK ₁₃	47.0	0.106
CT ₄₂	46.5	0.077
CT ₃₇	44.0	0.176
CT ₁₂	43.5	0.161
CK ₄₁	41.0	0.092
CK ₄₅	40.5	0.084
CK ₉	40.0	0.245
CK ₃₃	40.0	0.279
CK ₃	38.0	0.098
CK ₁₀	36.5	0.192

ตาราง 5 (ต่อ)

ไอโซเลท	Enzyme activity (mU/ml enzyme)	Specific activity (mU/mg)
CT ₄₃	36.0	0.069
CK ₂₅	36.0	0.080
CK ₃₉	36.0	0.125
CT ₂₈	35.5	0.231
CK ₃₀	35.0	0.283
CT ₃	34.5	0.110
CT ₃₄	34.5	0.077

3. ทดสอบความสามารถในการผลิตโคติเนสในอาหารแข็งเปลือกกุ้ง

จากการนำเชื้อราที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์สูงในอาหารเหลวEPMจำนวน 20 ไอโซเลทมาทดสอบการผลิตโคติเนสในอาหารแข็งเปลือกกุ้งที่มีการเติมอาหารพื้นฐานปริมาณ 10 มล. ร่วมกับเชื้อราที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Microbiology Section Chiang Mai University (MSCMU) ที่ได้เคยมีผู้ทดสอบแล้วว่าให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงอีกจำนวน 10 ไอโซเลท ได้ผลดังตาราง 6

ตาราง 6 Enzyme activity และ specific activity ของเอนไซม์จากเชื้อรา 20 ไอโซเลทเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเปลือกกุ้งผสมอาหารพื้นฐานเป็นเวลา 15 วัน

ไอโซเลท	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity (x10 ⁻³ mU/mg)
CK ₃₀ ***	51.5	3.30
CK ₄₄ ***	81.5	3.86
CK ₁₇	37.5	1.60
CK ₁₃	37.0	1.63
CT ₄₂ *	35.0	1.59
CT ₃₇	23.0	1.32

ตาราง 6 (ต่อ)

ไอโซเลท	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity ($\times 10^{-3}$ mU/mg)
CT ₁₂	19.0	0.92
CK ₄₁ ***	70.0	3.34
CK ₄₅	16.0	0.73
CK ₉	46.5	1.72
CK ₃₃ **	60.0	2.64
CK ₃	46.0	2.13
CK ₁₀	45.5	1.21
CT ₄₃	18.5	0.82
CK ₂₅	53.0	0.21
CK ₃₉ ***	63.5	5.16
CT ₂₈	46.0	2.03
CK ₃₀ ***	36.5	2.72
CT ₃ *	26.5	1.23
CT ₃₄ *	47.5	2.38

หมายเหตุ : *, **, *** แทนปริมาณเส้นใยเชื้อราที่ปกคลุมอาหาร * น้อย, ** ปานกลาง, *** มาก

ตาราง 7 Enzyme activity และ specific activity ของเชื้อราที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ทำการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์ในอาหารแข็งเปลือกกุ้ง

ไอโซเลท	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity ($\times 10^{-3}$ mU/mg)
P ₅	16.0	1.08
BB ₄	25.0	1.05
C ₂	28.0	1.21

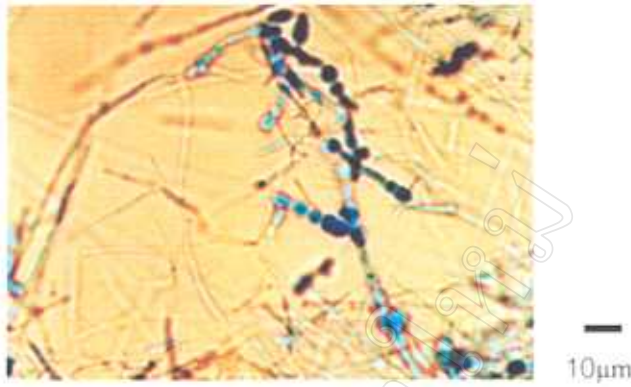
ตาราง 7 (ต่อ)

ไอโซเลท	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity ($\times 10^{-3}$ mU/mg)
P ₁₁	36.5	1.69
CH ₂₁	45.5	2.10
P ₁₄	23.0	0.94
BB ₆	19.0	1.32
73	36.5	0.07
A ₅	22.5	0.07
M ₁	16.0	1.08

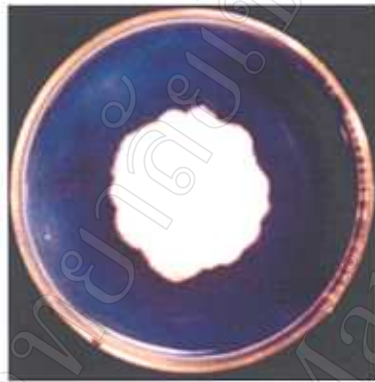
พบว่าเชื้อราไอโซเลท CK₄₄ ให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 81.5 mU/ml specific activity 3.86×10^{-3} mU/mg รองลงมาคือ CK₃₉ ให้ค่า enzyme activity 63.5 mU/ml specific activity 5.16×10^{-3} mU/mg

4. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของเชื้อราไอโซเลท CK₄₄

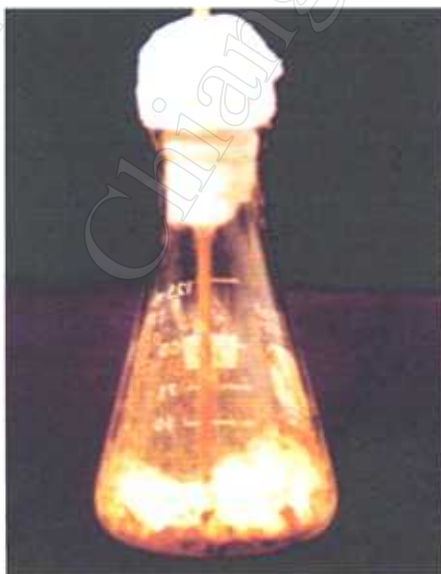
จากการศึกษาโครงสร้างของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า เส้นใยของเชื้อรา มีขนาด $2.45 \mu\text{m}$ มีผนังกันตามขวาง มีการสร้างโคนิเดียขนาด $(3.75-5) \times 5 \mu\text{m}$ ซึ่งมีรูปร่างค่อนข้างกลมฐานตัด สีค่อนข้างใส เป็นเซลล์เดี่ยวเรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ (basipetal chain) เมื่อนำมาจัดลำดับทางอนุกรมวิธานตามหนังสือ Illustrated Genera of Imperfect Fungi พบว่าจัดอยู่ในจีนัส *Basipetospora* sp (ภาพ 2) ลักษณะของเชื้อราไอโซเลท CK₄₄ ที่เจริญในอาหาร MYG agar มีเส้นใยสีเหลือง ฟู่ (ภาพ 3) ลักษณะของเชื้อราไอโซเลทนี้ที่เจริญในอาหารแข็งเปลือกกุ้งมีลักษณะสีเหลืองฟู่ เห็นเส้นใยได้ชัดเจน (ภาพ 4) ลักษณะของเชื้อราไอโซเลท CK₄₄ ที่เจริญในอาหาร MYG agar, Czapek's, chitin overlay plate, chitin agar อายุ 5 วัน เปรียบเทียบกันดังภาพ 5



ภาพ 2 ลักษณะ โคนิเดียมของ *Basipetospora* sp CK₄₄ (ติดสีย้อม cotton blue)



ภาพ 3 ลักษณะการเจริญของ *Basipetospora* sp CK₄₄ บน MYG agar อายุ 5 วัน



ภาพ 4 ลักษณะการเจริญของ *Basipetospora* sp CK₄₄ บนอาหารแข็งเปลือกกุ้ง อายุ 15 วัน

5. ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Basipetospora* sp CK₄₄

จากการเพาะเลี้ยง *Basipetospora* sp CK₄₄ ที่อุณหภูมิห้อง 20, 30, 37, และ 45°C เป็นเวลา 5 วัน พบว่า *Basipetospora* sp CK₄₄ เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30°C ที่อุณหภูมิ 45°C เชื้อราไม่สามารถเจริญได้ ดังตาราง 8 และภาพ 6

ตาราง 8 การเจริญของ *Basipetospora* sp CK₄₄ บนอาหาร MYG agar ที่อุณหภูมิห้อง, 20, 30, 37, และ 45°C เป็นเวลา 5 วัน

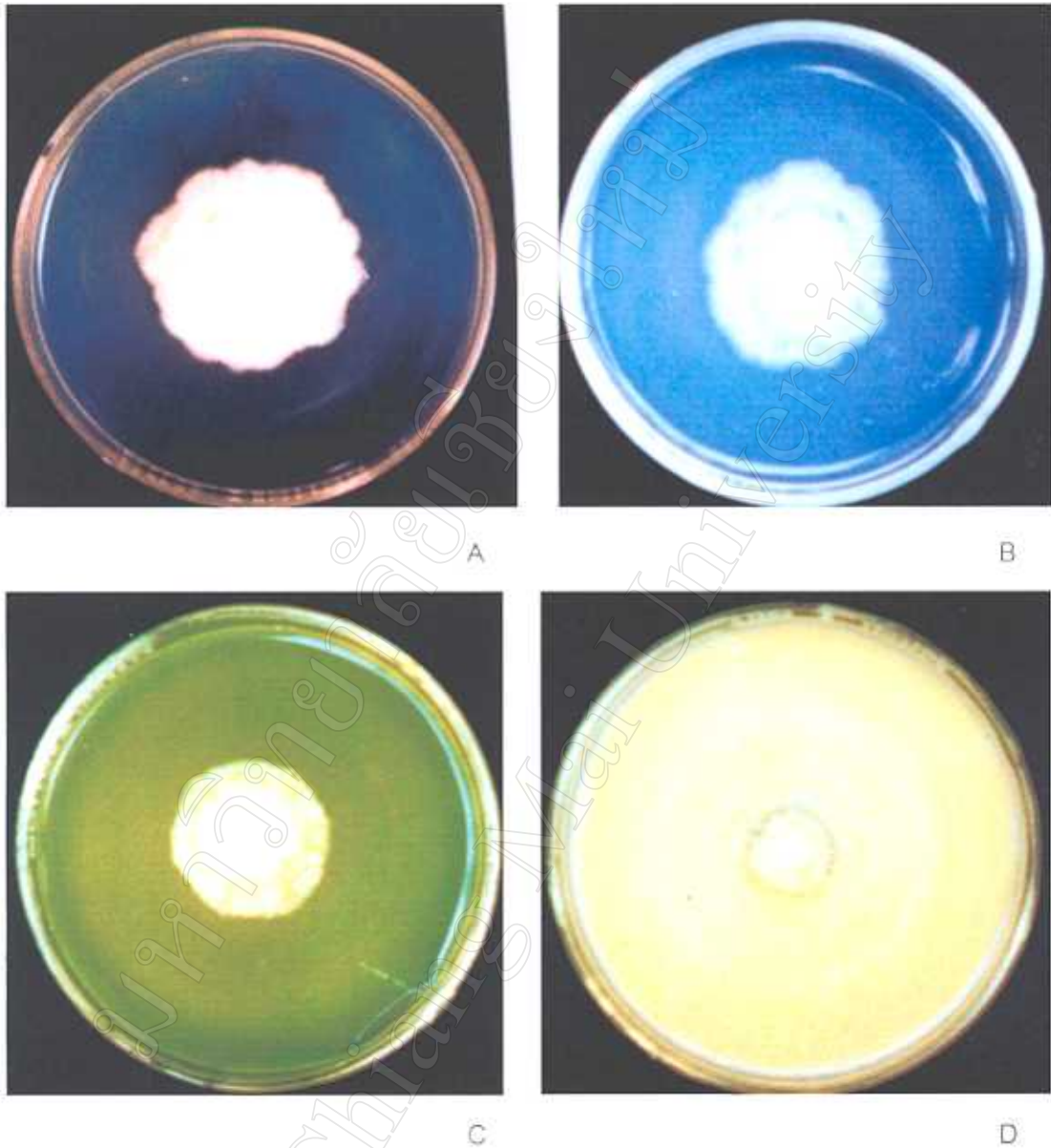
อุณหภูมิ	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (cm)				
	1 วัน	2 วัน	3 วัน	4 วัน	5 วัน
อุณหภูมิห้อง	1.1	1.8	2.6	3.0	3.7
20°C	0.9	1.2	1.5	2.0	2.5
30°C	1.2	1.8	2.2	3.1	3.9
37°C	1.0	1.5	2.3	3.5	3.7
45°C	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

6. ผลของ pH ต่อการเจริญของ *Basipetospora* sp CK₄₄

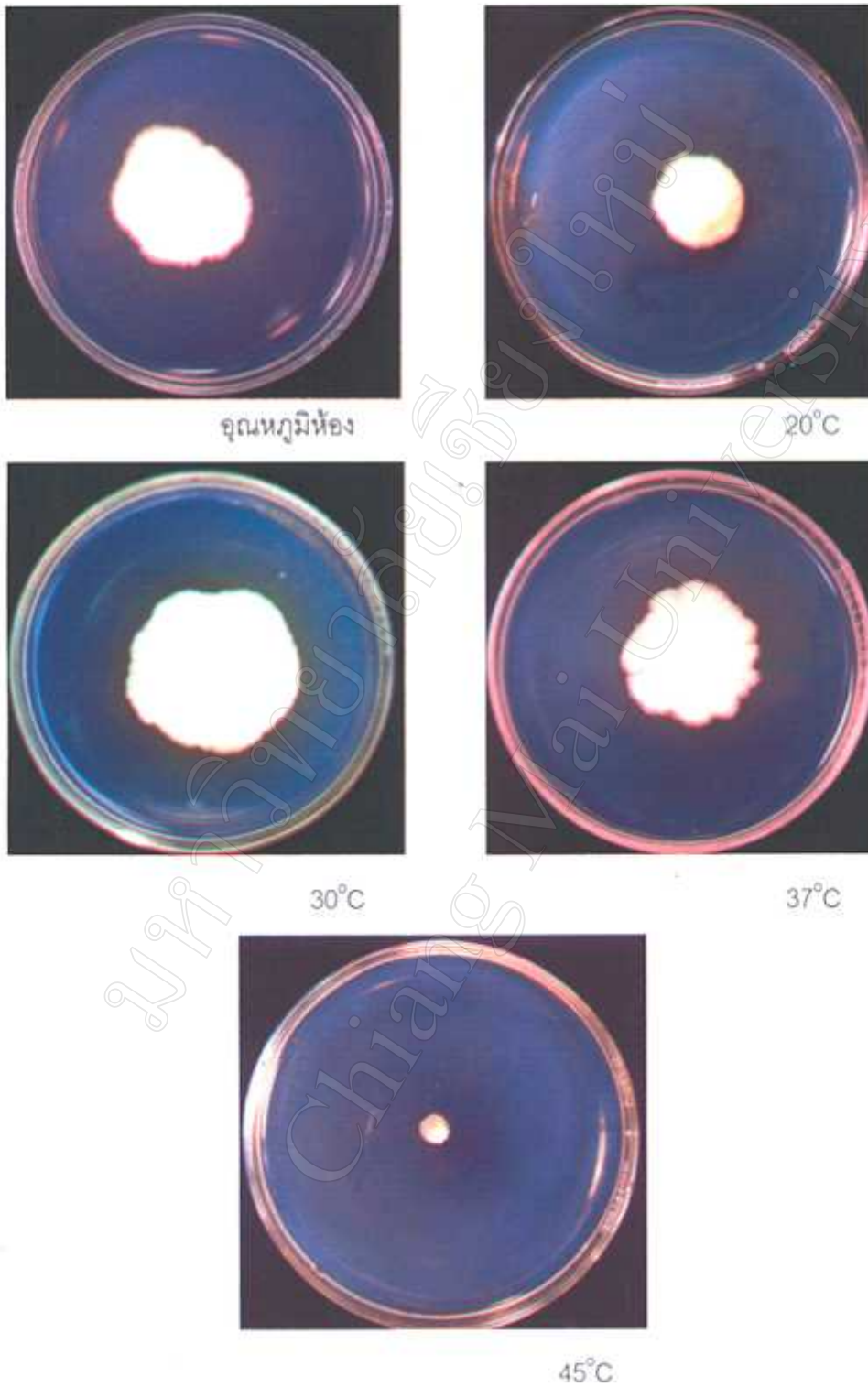
จากการเพาะเลี้ยง *Basipetospora* sp CK₄₄ บนอาหารแข็ง MYG pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, และ 8.0 ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า *Basipetospora* sp CK₄₄ เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร MYG pH 8.0 ดังตาราง 9

ตาราง 9 การเจริญของ *Basipetospora* sp CK₄₄ บนอาหาร MYG ที่ pH ต่างกันเป็นเวลา 5 วัน

เวลา (วัน)	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (cm)								
	pH 4	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
1	0.7	1.2	0.9	1.2	1.0	0.9	1.0	1.0	0.8
2	1.2	1.5	1.5	1.6	1.7	1.5	1.7	1.7	2.1
3	1.8	2.2	2.0	2.4	2.3	2.7	2.3	2.5	2.5
4	2.3	2.7	2.7	2.7	3.3	3.0	3.7	3.0	3.5
5	2.7	3.5	3.2	3.4	3.8	3.8	3.7	3.7	4.2



ภาพ 5 ลักษณะการเจริญของ *Basipetospora* sp CK₄ บนอาหาร MYG agar (A), Czapek's (B), chitin overlay plate (C), และ chitin agar (D) อายุ 5 วัน

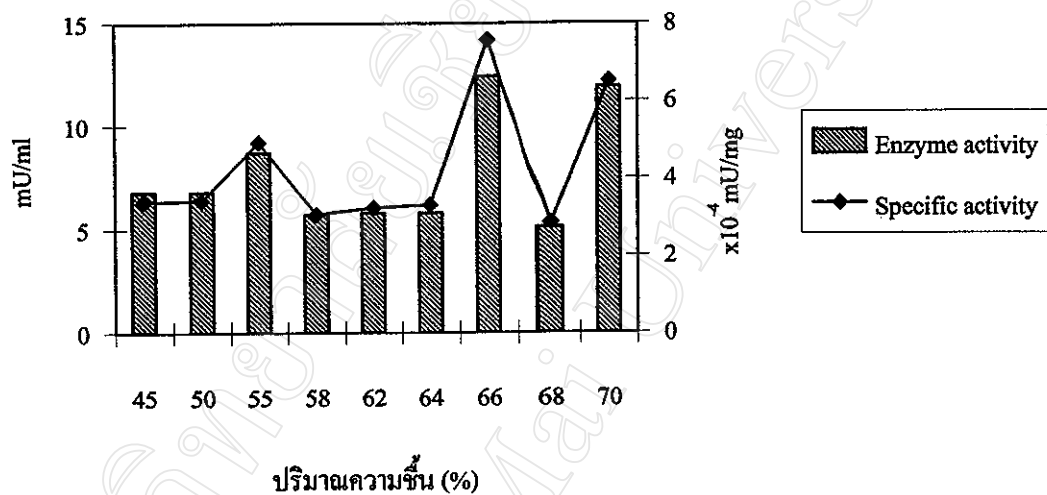


ภาพ 6 ลักษณะการเจริญของ *Basipetospora* sp CK₄ บนอาหาร MYG agar ที่อุณหภูมิห้อง 20°C , 30°C, 37°C, และ 45°C เป็นเวลา 5 วัน

5. สภาพที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ของ *Basipetospora* sp CK₄₄

7.1. ผลของปริมาณความชื้นของการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตโคติเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

จากการศึกษาผลของปริมาณความชื้นของการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตโคติเนส ของ *Basipetospora* sp CK₄₄ ดังตาราง 20 และภาพ 7



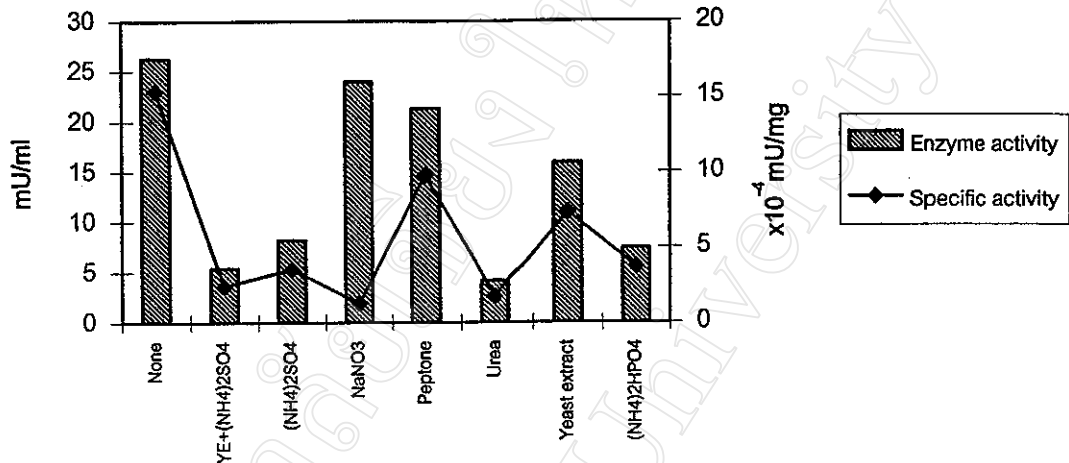
ภาพ 7 ผลของปริมาณความชื้นของการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตโคติเนส ของ *Basipetospora* sp CK₄₄

พบว่าปริมาณความชื้นที่ 67% เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์มากที่สุด โดยมีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 12.4 mU/ml มีค่า specific activity เท่ากับ 7.57×10^{-4} mU/mg จะเห็นว่าค่าการทำงานของเอนไซม์ที่ได้ต่ำกว่าตอนที่ทำการคัดเลือกเชื้อมาก อาจเนื่องจากการใช้เปลือกกุ้งผสมกับ BSM 4 มล. และน้ำกลั่น 6 มล.. ซึ่งปริมาณสารอาหารน้อยกว่าอาหารที่ใช้ในขั้นตอนการคัดเลือกเชื้อ (ใช้เปลือกกุ้ง 5 กรัม ผสมกับ BSM 10 มล.) ดังนั้นในขั้นตอนการทดสอบต่อไปจึงใช้อาหารเหมือนตอนคัดเลือกเชื้อ

7.2. ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตโคติเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราโดยใช้ BSM ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน และมีชุดควบคุมคือ BSM ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนเลย และ BSM ที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2% (w/v) กับ Yeast extract 1% (w/v) เหมือนตอนที่ใช้ในขั้นตอนการคัดเลือกเชื้อ การเจริญของเชื้อในอาหารแข็งเปลือกกุ้งพบว่า

BSM ที่เติม YE+(NH₄)₂SO₄, urea และ (NH₄)₂HPO₄ ไม่มีการเจริญของเชื้อ ส่วน BSM ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน NaNO₃, Yeast extract และ Peptone พบว่ามีการเจริญของเชื้อเราได้ผลดัง ตาราง 21 และภาพ 8

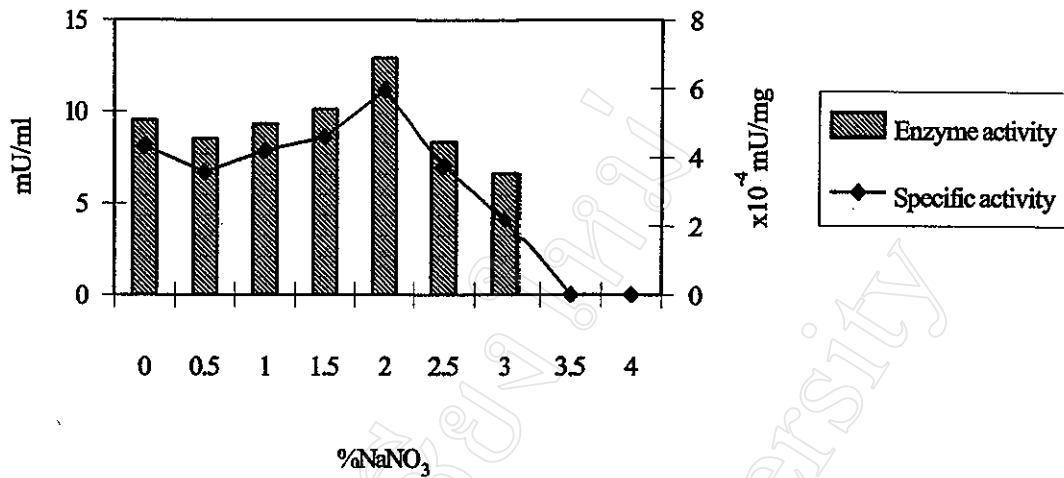


ภาพ 8 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตโคตินเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

พบว่า *Basipetospora* sp CK₄₄ ให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 81.5 mU/ml specific activity 3.86x10⁻³ mU/mg รองลงมาคือ CK₃₉ ให้ค่า enzyme activity 63.5 mU/ml specific activity 5.16x10⁻³ mU/mg

7.3. ผลของปริมาณ NaNO₃ ที่มีต่อการผลิตโคตินเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้ BSM ที่มีปริมาณ NaNO₃ ต่างๆกัน และมีชุดควบคุมคือ BSM ที่ไม่เติม NaNO₃ พบว่ามีการเจริญของเชื้อในทุกชุดการทดลอง ส่วนค่า enzyme activity และ specific activity ได้ผลดัง ตาราง 22 และ ภาพ 9



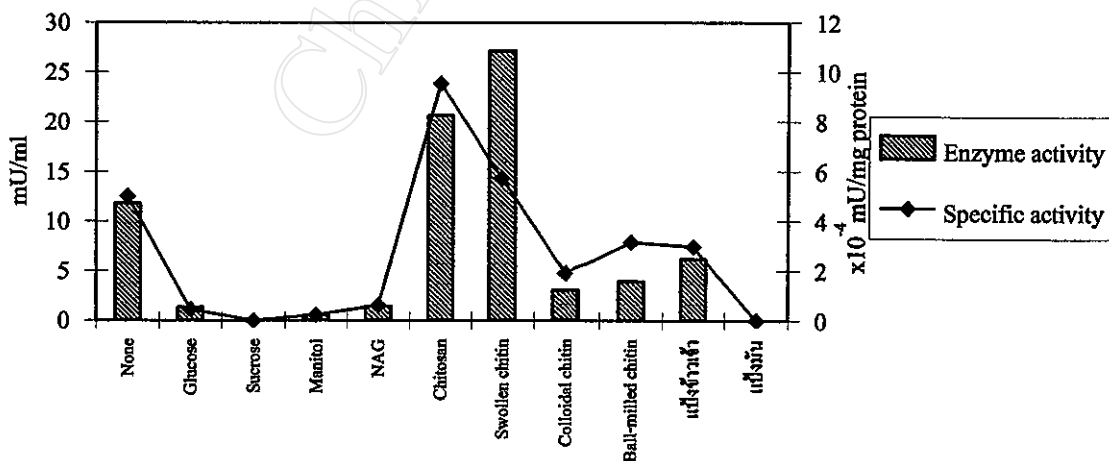
ภาพ 9 ผลของปริมาณ NaNO₃ ที่มีต่อการผลิตไคตินเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

พบว่า NaNO₃ 2% (w/v) เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเนสมากที่สุด โดยให้ค่า enzyme activity เท่ากับ 12.9 mU/ml และ specific activity 5.96x10⁻⁴ mU/mg ส่วน BSM ที่มีปริมาณ NaNO₃ มากกว่า 2% (w/v) จะมีค่า enzyme activity ลดลงเรื่อยๆจนปริมาณ NaNO₃ เท่ากับ 3.5% (w/v) ใน BSM จึงหมด enzyme activity

7.4. ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตไคตินเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

ผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อราโดยใช้ BSM ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆพบว่าทุกชุดการทดลองไม่มีการเจริญของเชื้อเลย ส่วนค่า enzyme activity และ specific activity ได้ผลดัง ตาราง 23 และ

ภาพ 10

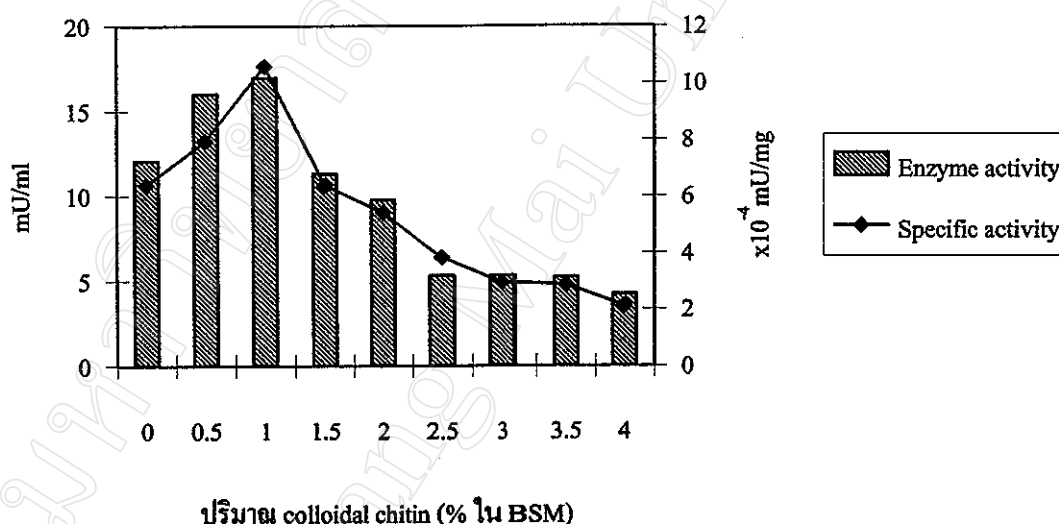


ภาพ 10 ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตไคตินเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

พบว่า BSM ที่มี colloidal chitin 1% (w/v) เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเนสมากที่สุด โดยให้ค่า enzyme activity เท่ากับ 27.1 mU/ml และ specific activity 5.75×10^{-4} mU/mg รองลงมาคือ BSM ที่มี chitosan 1% (w/v) จะมีค่า enzyme activity เท่ากับ 20.6 mU/ml และ specific activity 9.5×10^{-4} mU/mg protein ส่วน BSM ที่มี sucrose หรือแป้งมัน 1% (w/v) พบว่าไม่มี enzyme activity เลย

7.5. ผลของปริมาณ colloidal chitin ที่มีต่อการผลิตไคตินเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

ผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อราโดยใช้ BSM ที่มี colloidal chitin ในปริมาณต่างๆพบว่าทุกชุดการทดลองมีการเจริญของเชื้อในปริมาณเท่าๆกัน ค่า enzyme activity และ specific activity ได้ผลดังตาราง 24 และภาพ 11

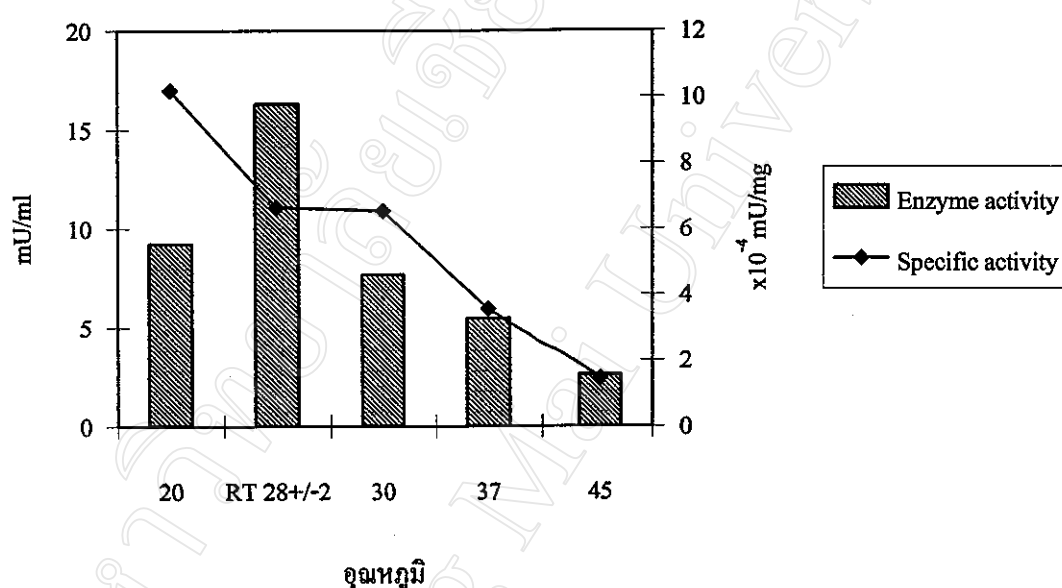


ภาพ 11 ผลของปริมาณ colloidal chitin ที่มีต่อการผลิตไคตินเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

พบว่า colloidal chitin 1% (w/v) ใน BSM เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเนสมากที่สุด โดยให้ค่า enzyme activity เท่ากับ 16.95 mU/ml และ specific activity 10.58×10^{-4} mU/mg BSM ที่มี colloidal chitin มากกว่า 1% (w/v) ขึ้นไปจะมีค่า enzyme activity ลดลงเรื่อยๆ

7.6. ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Basipetospora* sp CK₄₄ ในอาหารแข็งเปลือกกุ้งเพื่อผลิตเอนไซม์

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราโดยการเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 20°C มีการเจริญของเชื้อรามากที่สุด รองลงมาคือ 30°C อุณหภูมิห้อง 37°C ที่อุณหภูมิ 45 °C ไม่มีการเจริญของเชื้อราเลย ค่า enzyme activity และ specific activity ได้ผลดัง ตาราง 25 และ ภาพ 12

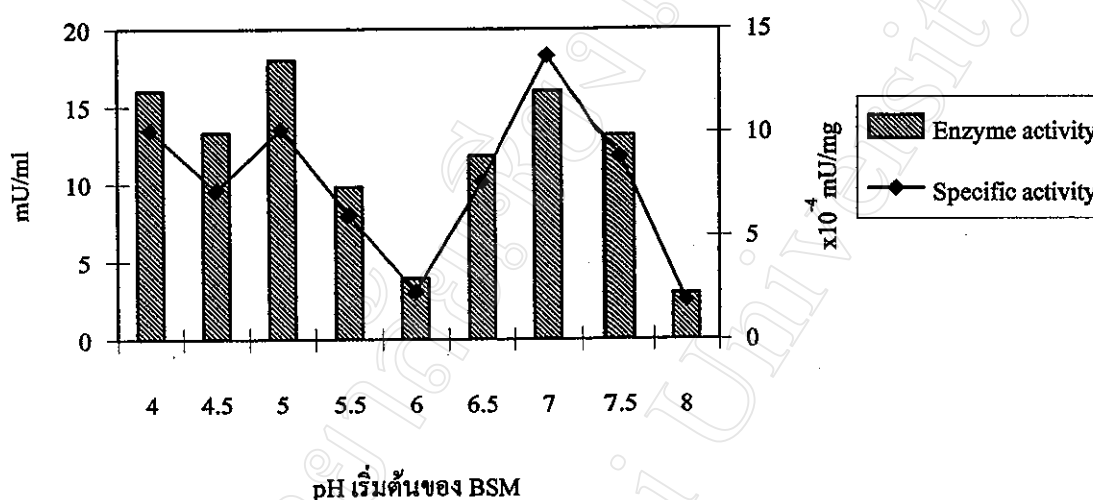


ภาพ 12 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Basipetospora* sp CK₄₄ ในอาหารแข็งเปลือกกุ้งเพื่อผลิตโคติเนส

พบว่าที่อุณหภูมิห้อง (28 $\pm$ 2°C) เหมาะสมต่อการผลิตโคติเนสมากที่สุด โดยให้ค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 16.0 mU/ml และ specific activity 6.64 $\times 10^{-4}$ mU/mg รองลงมาคืออุณหภูมิ 20°C ให้ค่า enzyme activity เท่ากับ 9.20 mU/ml และ specific activity 10.19 $\times 10^{-4}$ mU/mg

7.7. ผลของ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานต่อการผลิตเอนไซม์

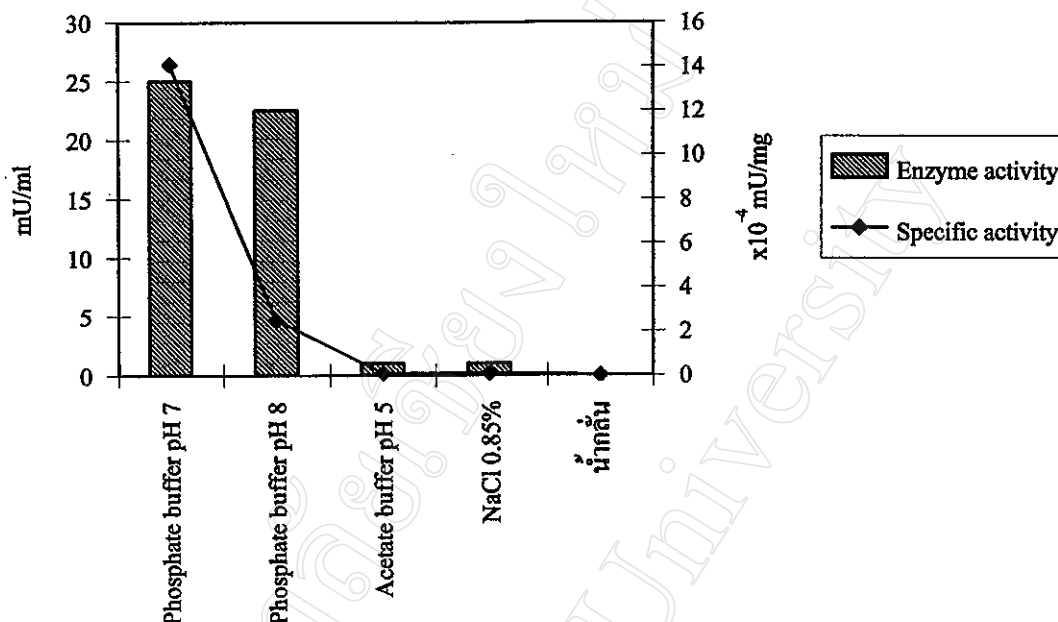
จากการศึกษาผลของ pH เริ่มต้นของ BSM ต่อการผลิตไคตินเนสพบว่าทุกชุดการทดลองมีการเจริญของเชื้อราเท่าๆกัน ค่า enzyme activity และ specific activity ได้ผลดังตาราง 26 และ ภาพ 13



ภาพ 13 ผลของ pH เริ่มต้นของ BSM ต่อการผลิตไคตินเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

7.8. ผลของชนิดของสารสกัดต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

จากการใช้buffer NaCl 0.85% และน้ำกลั่น ในการสกัดเอนไซม์พบว่าสารต่างๆให้ค่า enzyme activity และ specific activity ได้ผลดัง ตาราง 27 และ ภาพ 14

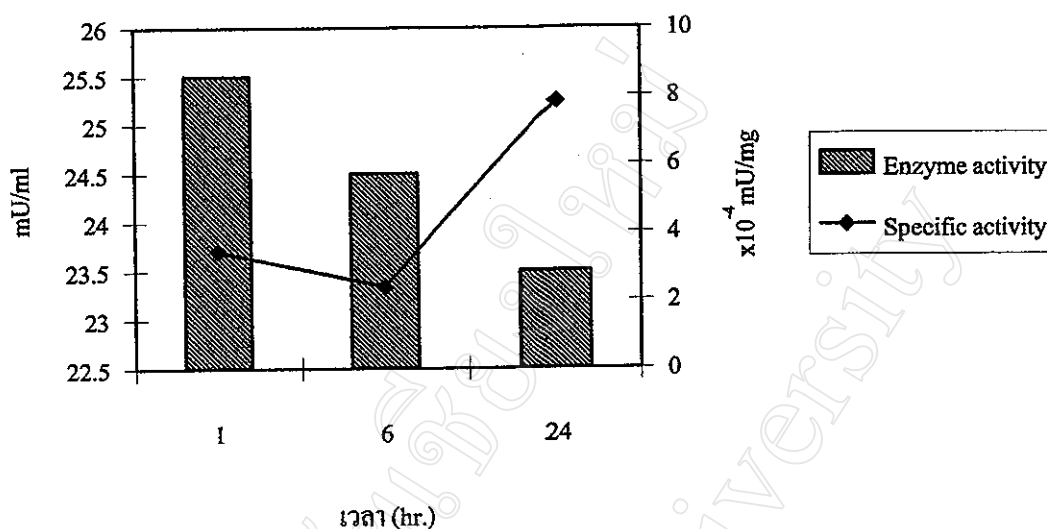


ภาพ 14 ผลของชนิดของสารสกัดต่อการผลิตโคคิเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

จากการสกัดเอนไซม์ด้วยสารต่างๆพบว่า ใช้ 0.2 M phosphate buffer pH 7 ในการสกัดเอนไซม์จะให้ค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 25.0 mU/ml และ specific activity 14.1×10^{-4} mU/mg รองลงมาคือ 0.2 M phosphate buffer pH 8 ให้ค่า enzyme activity 22.5 mU/ml และ specific activity 2.5×10^{-4} mU/mg ส่วนน้ำกลั่น ไม่มี enzyme activity เลย

7.9. ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดต่อการผลิตโคคิเนส

จากการศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ต่อการผลิตโคคิเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄ พบว่าค่า enzyme activity และ specific activity ได้ผลดังตาราง 28 และภาพ 15



ภาพ 15 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ที่มีต่อการทำงานของโคตินเนสจาก *Basipetospora* sp CK₄₄

พบว่า การสกัดเอนไซม์เป็นเวลา 1 ชั่วโมงให้ค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 25.5 mU/ml และ specific activity 3.49×10^{-4} mU/mg การสกัดโดยใช้เวลา 6 หรือ 24 ชั่วโมง ให้ผลแตกต่างจากการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพียงเล็กน้อย

7.10. ผลการศึกษาการ treated เปลือกกุ้งด้วยกรดและด่างเพื่อใช้ในการเตรียมอาหาร

ความแตกต่างระหว่างอาหารที่ใช้เปลือกกุ้งที่ treated ด้วยกรดและด่างกับเปลือกกุ้งที่ไม่ได้ treated ดูจากค่า enzyme activity และ specific activity ได้ผลดังตาราง 10

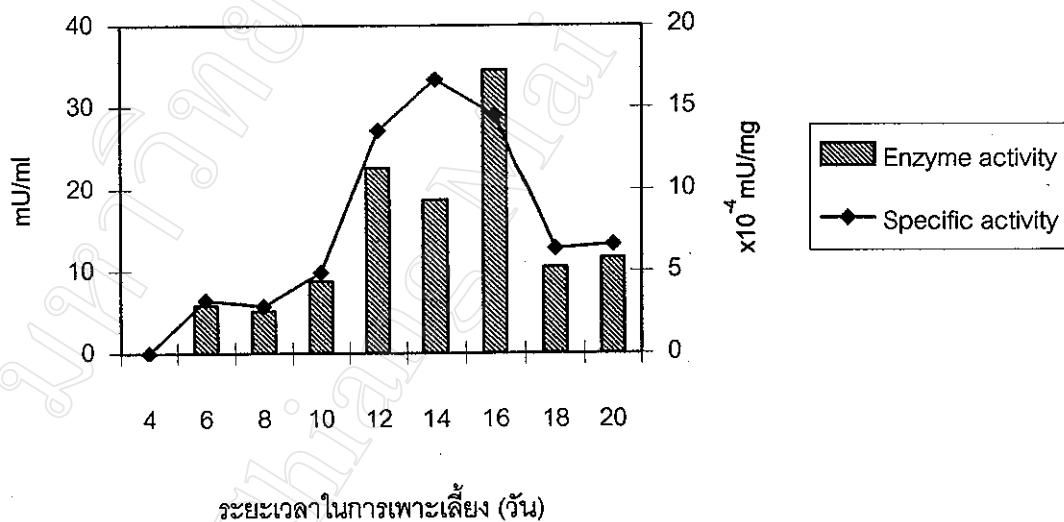
ตาราง 10 ผลของการ treated เปลือกกุ้งด้วยกรดและด่างเพื่อใช้ในการเตรียมอาหารที่มีต่อการผลิตโคตินเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

เติมกรด, ด่าง	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity ($\times 10^{-4}$ mU/mg)
เติม	0.0	0.0
ไม่เติม	34.0	1.6

พบว่าเปลือกกุ้งที่ treated กรดต่างไม่มีการทำงานของเอนไซม์ ส่วนเปลือกกุ้งที่ไม่ treated กรดและต่าง พบว่ามีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 34.0 mU/ml และ specific activity 1.6×10^{-4} mU/mg จากการสกัดเอนไซม์พบว่า crude enzyme ของอาหารที่มีการ treated กรดต่างในเปลือกกุ้งจะมีลักษณะใสกว่าอาหารที่มีเปลือกกุ้งที่ไม่ได้ treated กรดต่าง และพบว่าอาหารที่มีเปลือกกุ้งที่ treated กรดต่างมีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าอาหารที่มีเปลือกกุ้งที่ไม่ได้ treated กรดต่างมาก โดยพบว่าไม่ต้องทำเจือจางเอนไซม์ก่อนที่จะนำมาหาค่าปริมาณโปรตีน ในขณะที่อาหารที่มีเปลือกกุ้งที่ไม่ได้ treated กรดต่างต้องทำเจือจางเอนไซม์ถึง 30 เท่า

7.11. ผลการศึกษาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง *Basipetospora* sp CK₄₄ เพื่อผลิตโคติเนส

จากการใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง *Basipetospora* sp CK₄₄ ที่ต่างกัน พบว่าในระยะเวลาต่างๆมีค่า enzyme activity และ specific activity ดังตาราง 29 และภาพ 16

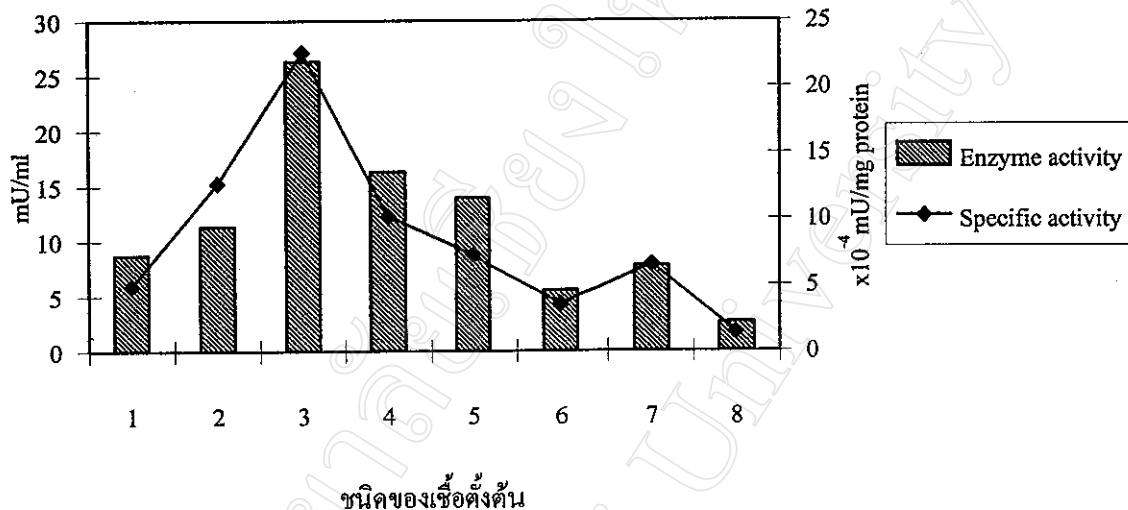


ภาพ 16 ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง *Basipetospora* sp CK₄₄ เพื่อผลิตโคติเนส

พบว่า *Basipetospora* sp CK₄₄ เริ่มมี enzyme activity ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงและเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนสูงสุดในวันที่ 16 โดยมีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 34.5 mU/ml และ specific activity 14.5×10^{-4} mU/mg จากนั้นเชื้อราจะมี enzyme activity ลดลงเรื่อยๆ

7.12. ผลของชนิดเชื้อตั้งต้นในการเพาะเลี้ยง *Basipetospora* sp CK₄₄ เพื่อผลิตไคตินเนส

จากการใช้วิธีการเตรียมเชื้อตั้งต้นแบบต่างๆเพื่อใช้เพาะเลี้ยง *Basipetospora* sp CK₄₄ เพื่อผลิตไคตินเนสได้ผลดังตาราง 30 และภาพ 17



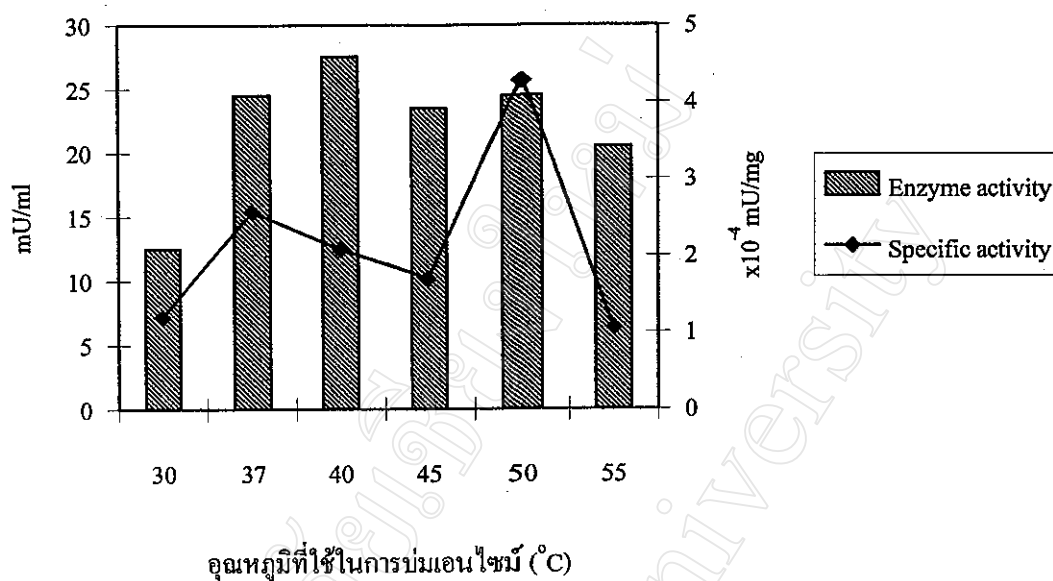
ภาพ 17 ผลของชนิดของเชื้อตั้งต้นในการเพาะเลี้ยง *Basipetospora* sp CK₄₄ เพื่อผลิตไคตินเนส

การเลี้ยงเชื้อราในอาหารวุ้นเยือก PDA อายุ 7 วันแล้วนำมาเตรียมเป็น spore suspension เป็นวิธีการเตรียมเชื้อตั้งต้นที่ให้ม้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 26.3 mU/ml และ specific activity 22.6×10^{-4} mU/mg

8. ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของ crude enzyme

8.1. อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรท

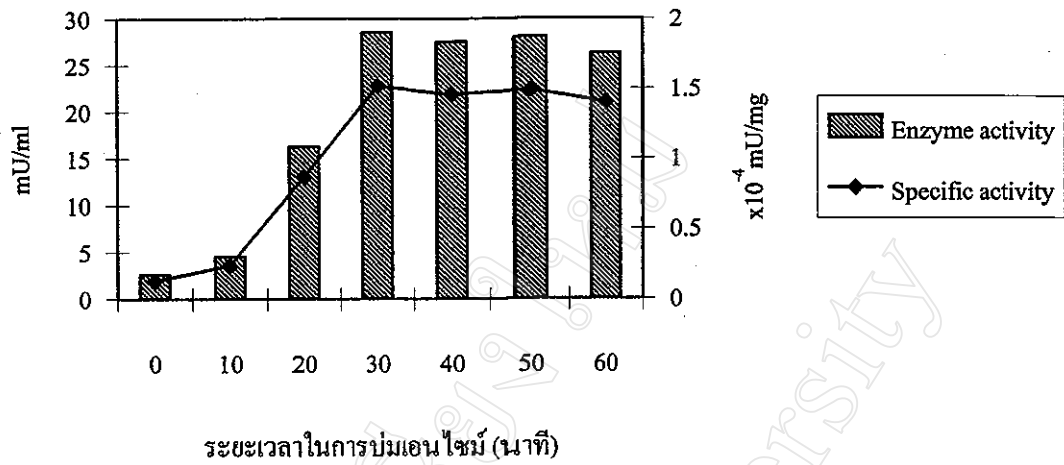
จากการบ่ม reaction mixture ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40°C มีค่า enzyme activity เท่ากับ 27.5 mU/ml และ specific activity 2.08×10^{-4} mU/mg ดังตาราง 31 และภาพ 18



ภาพ 18 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์กับสัณสเตรทต่อการทำงานของโคติเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

8.2. เวลาที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์กับสัณสเตรท

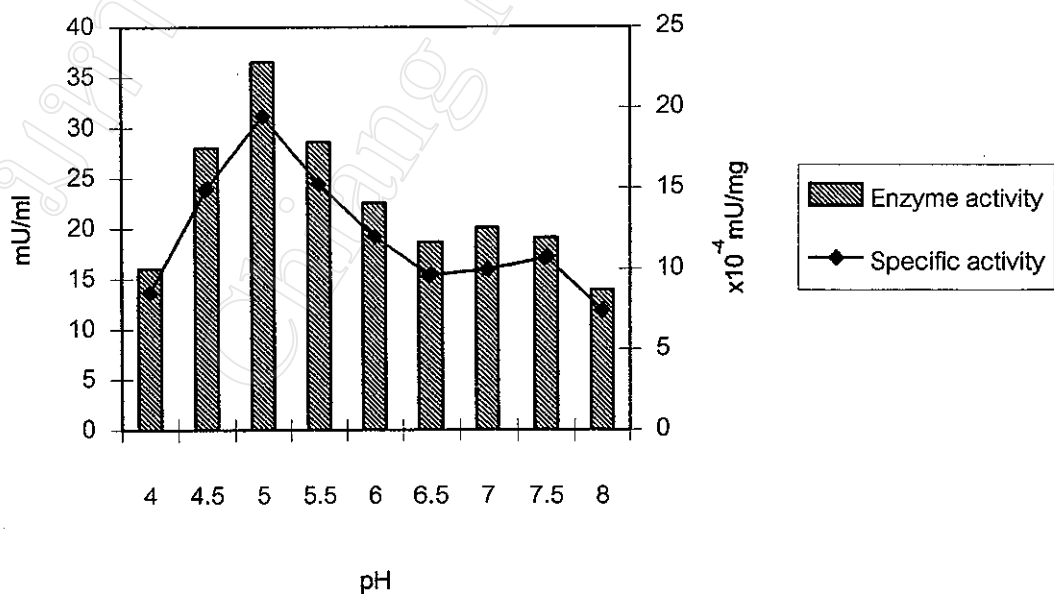
ผลจากการบ่ม reaction mixture ที่อุณหภูมิ 40°C เวลา 0, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที พบว่าเวลา 0-20 นาทีจะมีค่าการทำงานของเอนไซม์สูงขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งที่เวลา 30 นาทีขึ้นไป จะพบว่ามี enzyme activity ในระดับที่ไม่ต่างกันมากนัก ดังนั้นช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการบ่มเอนไซม์จึงเท่ากับ 30 นาที โดยให้ค่า enzyme activity เท่ากับ 28.5 mU/ml และ specific activity 1.52×10^{-4} mU/mg ดังตาราง 32 และภาพ 19



ภาพ 19 ผลของการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรทที่อุณหภูมิ 40°C ในระยะเวลาต่างกันต่อการทำงานของโคติเนสของเชื้อรา *Basipetospora* sp CK₄₄

8.3. pH ที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรท

ผลจากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ในช่วง pH 4-8 โดยใช้ colloidal chitin เป็นสับสเตรท บ่ม reaction mixture ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วง pH ที่ค่อนข้างเป็นกรด และทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 5.0 ดังตาราง 33 และภาพ 20



ภาพ 20 ผลของ pH ที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรทต่อการทำงานของโคติเนสจาก *Basipetospora* sp CK₄₄

8.4. ชนิดของไคตินที่ใช้เป็นสับสเตรท

จากการศึกษาใช้สับสเตรทเป็นไคติน 3 ชนิดคือ ball-milled chitin, colloidal chitin และ swollen chitin พบว่าชนิดของไคตินมีผลต่อ enzyme activity คือ เมื่อใช้ colloidal chitin เป็นสับสเตรทจะมี enzyme activity และ specific activity สูงสุดเท่ากับ 32.5 mU/ml และ 1.83×10^{-4} mU/mg ตามลำดับ ดังตาราง 11

ตาราง 11 ชนิดของไคตินที่ใช้เป็นสับสเตรทต่อการทำงานของไคติเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

ชนิดไคติน	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity ($\times 10^{-4}$ mU/mg)
Ball-milled chitin	18.2	1.02
Colloidal chitin	32.5	1.83
Swollen chitin	21.3	1.20

9. ผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

จากการทดลองเบื้องต้นเพื่อหาช่วง %saturation ที่เหมาะสมที่ตกตะกอนให้ค่า enzyme activity 0-100% พบว่าตกตะกอนมี activity 0% ที่ความเข้มข้นของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เท่ากับ 40% และที่ความเข้มข้น 60% ตกตะกอนมี enzyme activity 100% (supernatant มี enzyme activity เท่ากับ 0) ดังตาราง 12 เพราะฉะนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกตกตะกอนครั้งแรกที่ 0-40% saturation และตกตะกอนครั้งที่ 2 ที่ 40-60% saturation

ตาราง 12 ผลของการตกตะกอน culture filtrate ของ *Basipetospora* sp CK₄₄ ด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้นต่างๆที่มีต่อการทำงานของไคติเนส

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity ($\times 10^{-4}$ mU/mg)
0	21.7	0.0
20	23.2	0.0
30	22.4	0.0
40	24.2	0.0
50	13.4	12.5
60	0.0	21.3
80	0.0	23.2

จากการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate ที่ 0-40% saturation แล้วนำ supernatant ที่ได้ตกตะกอนอีกครั้งที่ 40-60% แล้วนำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นพบว่า specific activity เพิ่มขึ้น โดยเพิ่มจาก 6.38×10^{-4} mU/mg เป็น 0.14 mU/mg แสดงว่าบริสุทธิ์ขึ้น 214.73 เท่า ดังตาราง 13

ตาราง 13 ผลของการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนด้วยการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

ตัวอย่าง	Enzyme activity (mU/ml)	Specific activity ($\times 10^{-4}$ mU/mg)	Purification (fold)
Crude enzyme ที่ไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ขึ้น	26.6	6.38	1
Crude enzyme ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน	38.0	0.14	214.73

หมายเหตุ : *Degree of purification = specific activity at step 2/specific activity at step 1